

文章编号: 1004-7271(2000)04-0329-05

微生态制剂中抑菌物质的分析

李淑侠, 齐凤兰, 陈有容, 奚锐华, 张蔚

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘要:本文以一种市售微生态制剂为试材,对其产生的抑菌活性物质的生化性质做了研究,发现该抑菌物质显示活性的pH范围为4.0~6.0, pH值变化对其活性影响较大, pH值为7.0时活性全部消失;该活性物质对热不敏感, 121℃处理30min后,其活性无明显变化;紫外光照射也不能使它失活;随发酵时间的延长,发酵液中的抑菌活性物质逐渐增加。根据其生化性质可以判断该抑菌物质是一种分子量较小,结构较简单的多肽,具有广谱抑菌性,对一些常见的食物腐败菌和致病菌均有较好的抑制作用。它不仅能抑制革兰氏阳性菌,而且对革兰氏阴性菌也有较好的抑制作用。

关键词:微生态制剂;抑菌圈;益生菌

中图分类号:TS201.3 **文献标识码:** A

Detection of antibacterial Substance from Microecological Modulator

LI Shu-xia, QI Feng-lan, CHEN You-tong, XI Rui-hua, ZHANG Wei

(College of Food Science, SFU, Shanghai 200090, China)

Abstract: A kind of antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* from microecological modulator was studied in this paper. Some biochemical characteristics of it was studied. It was pH-dependent and heat-stable. The antibacterial substance was found to be stable between pH 4 and 6 and under strong heating conditions (121℃ for 30 min). Antimicrobial activity of the substance wasn't lost after treatment with Ultraviolet light. Antimicrobial activity gradually increased during the fermentation. The antibacterial substance showed wide range of action, inhibiting the growth of several food-borne pathogens and food spoilage bacteria including *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus coli*, *Listeria* spp., *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*.

Key words: Microecological modulator; inhibition zone; probiotics

微生态制剂,也称微生态调节剂,用来调整微生态失衡,提高宿主(人或动物等)健康水平或增进健康状态的益生菌及其代谢产物和生长促进物质的制品。按其成分主要分为:益生菌、益生元、合生剂^[1]。近年来,微生态制剂的保健、长寿和美容作用等功效,不断为现代医学所揭示,它作为嗜好性食品迅速发展^[2-4]。微生态制剂通常以乳酸菌为发酵起始菌种。乳酸菌作为微生态制剂中的成员越来越引起重视。乳酸菌是一类可发酵利用碳水化合物而产生大量乳酸的革兰氏阳性菌。乳酸菌代谢产生的有机酸、低聚糖、多糖、细菌素是它具有特殊的保健功能的原因所在,其中细菌素与它的多种保健功能息息相关。细菌素是细菌代谢过程中合成并分泌到环境中的一类对同种的亲源关系比较近的种有抑制作用的蛋白类抑菌物质。到目前为止已描述了40余种乳酸菌细菌素,它们是一种复杂的拮抗物,其分子量、生化特性、敏感范围、及其作用方式具有较大差异。近年来随着分子生物学和生物技术的发展,有关细菌

收稿日期: 2000-06-20

作者简介:李淑侠,(1977-),女,安徽砀山人,本校1998级研究生,研究方向为食品发酵工程。

素尤其是乳酸菌细菌素的研究引起了广大的关注,成为研究的热点。本文以一种市售微生态制剂为材料,对其产生的细菌素的生化性质做了初步研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂

考马斯亮蓝 G-250——Fluka 进口分装,上海化学试剂站分装厂;乳酸——化学纯,武汉市无机盐化工厂;过氧化氢——分析纯,上海桃浦化工厂;牛津杯——8mm,国家药典 1995 年版,上海化学试剂供应站。

1.1.2 菌种和培养基

本试验选用 8 种常见的食物污染菌和致病菌以及 3 种用于食品发酵工业的乳酸菌作为检验抑菌能力的指示菌,菌种名称及培养基见表 1。

1.2 方 法

1.2.1 抑菌作用测定方法

抑菌活性测定检测采用杯碟法^[5]。

1.2.2 有机酸的检测与排除

发酵液对指示菌的抑制作用,可能是酸的作用。采用气相色谱法^[6]分析样品中的有机酸,根据分析结果采用 pH 值 4.0 的乳酸做对照以排除有机酸的干扰。

1.2.3 过氧化氢的检测与排除

根据文献^[7]检测试样中是否有过氧化氢的存在以排除 H₂O₂ 对抑菌作用的影响。

1.2.4 抑菌谱的测定

以表 1 所列的菌种为指示菌,检测样液对各种指示菌的抑菌能力大小。

1.2.5 抑菌活性随 pH 值变化的敏感性

将抑菌物质粗提液的 pH 值分别调至 4.0、5.0、6.0、7.0,测定其残存的细菌素活性。

1.2.6 抑菌活性对热的敏感性

将 pH 值 4.0 的抑菌物质粗提液分别在 37℃、60℃、100℃、121℃ 下加热处理,测残存的抑菌活性。

1.2.7 紫外照射对抑菌活性的影响

将抑菌物质粗提液倒入一无菌皿中,置于紫外灯下 1h 后测抑菌活性,以未经照射的样品为对照。

1.2.8 发酵过程中生化参数的变化

发酵液接入适量(约 300μL/500mL)种子液,置 37℃ 恒温培养箱中静置培养,每隔 2h 取一次样,测定发酵液的 pH 值,溶液中的可溶性蛋白的量^[8](OD₅₉₅),菌浓(OD₆₀₀)^[9],抑菌活性(IH)生化参数的变化。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度条件下的抑菌活性

未浓缩样液和由发酵液浓缩,离心(4℃,8000r/min,15min)而得的浓缩 2.5 倍、5 倍、10 倍样液测抑菌活性。试验结果表明抑菌活性随浓缩倍数变化而变化,浓缩倍数越大,抑菌活性也越大,反之则越小,

表 1 指示菌种和培养基

Tab.1 Indicator bacteria and Media

菌 种	菌种来源	培养基
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	*	EMB 琼脂
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	*	BPA 琼脂
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	*	MYP 琼脂
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	*	MYP 琼脂
产气荚膜梭菌 <i>Clostridium perfringens</i>	*	TSC 琼脂
嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	*	MRS 琼脂
保加利亚乳杆菌 <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	*	MRS 琼脂
嗜热链球菌 <i>Streptomyces thermophilus</i>	*	MRS 琼脂
沙门氏菌 <i>Salmonella sp.</i>	**	HE 琼脂
西尔李斯特氏菌 <i>Listeria seeligeri</i>	**	TSA - YE
绵羊李斯特氏菌 <i>Listeria innocui</i>	**	TSA - YE

注: * 本校微生物实验室提供; ** 上海市商检局提供。

未浓缩样液则不显示抑菌活性。从抑菌圈大小的适宜程度及样品浓缩的经济角度考虑,以后实验中所用的样品浓缩倍数均为 10 倍(表 2)。

表 2 不同浓度条件下抑菌活性的大小

Tab.2 The inhibitory activity at different concentration

指示菌种	培养基	抑菌圈平均直径(mm)			
		10 倍样液	5 倍样液	2.5 倍样液	未浓缩样
蜡样芽孢杆菌	MYP 琼脂	21.9	18.7	16.3	0

2.2 H₂O₂ 的检测与排除

样液中 H₂O₂ 的含量小于 3×10^{-6} , 不产生抑菌作用, 所以可排除 H₂O₂ 对抑菌作用产生的影响(表 3)。

2.3 酸的检测与排除

试样中所含的有机酸主要为乳酸(表 4), 样品浓缩为原来浓度的 10 倍后 pH 值为 4.0, 所以用 pH 值为 4.0 的乳酸溶液作对照, 检测有机酸对抑菌作用的影响。试验结果表明样品中的有机酸对抑菌作用无影响, 因此可排除酸对抑菌作用的影响(表 5)。

综合 2.2 和 2.3 的试验结果, 可以排除了酸和 H₂O₂ 对抑菌作用的影响, 由此也可以推断产生抑菌作用的是其它类型的物质。

2.4 抑菌谱

将培养 24h 指示菌斜面, 稀释到菌悬液的浓度约为 10^7 /mL。将 1mL 菌悬液加入 100mL 培养基中, 摇匀后倒平板, 加入浓缩 10 倍抑菌物质粗提液, 观察对各种指示菌的抑菌作用。该抑菌物质对蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、产气荚膜梭菌、大肠杆菌、李斯特菌、沙门氏菌以及金黄色葡萄球菌等常见的食品腐败菌和致病菌均有显著的抑制作用, 对几食品发酵工业的乳酸菌, 如嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌以及嗜热链球菌则无抑制作用。该抑菌物质是一种广谱的抑菌物质, 其抑菌范围不仅限于亲缘关系较近的菌株, 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有较好的抑制作用(表 5)。

由实验结果的直观性、对比性和操作的简便程度, 选用蜡样芽孢杆菌作为指示菌。因为蜡样芽孢杆菌做指示菌, 抑菌圈较大(平均 21~22mm)便于观察和测量, 且 37℃ 培养不需特殊操作(如厌氧)。

2.5 抑菌物质在不同 pH 值条件下对热的敏感性

粗提液的抑菌活性对 pH 值变化敏感, 随着 pH 值的升高, 抑菌活性下降, 粗提液显示活性的范围为 pH 值 4.0~6.0, pH 值 7.0 时, 活性完全丧失。可以认为该抑菌物质是多肽类物质, 发挥活性要有一定

表 3 H₂O₂ 的检测结果Tab.3 The result of H₂O₂ test

样品	标准 H ₂ O ₂ 溶液 ($\times 10^{-6}$)			浓缩 10 倍发酵液
	5	3	1	
显色反应结果	+	+	-	-
抑菌活性	24.20	0	0	25.2

注: +, 加入淀粉后显蓝色; -, 入淀粉不显蓝色。

表 4 有机酸含量

Tab.4 content of organic acids

有机酸	甲酸	乙酸	丙酸	丁酸	乳酸
含量(g/L)	0.1516	0.1556	0.0073	痕量	2.5194

表 5 粗提液的抑菌谱

Tab.5 The antibacterial spectrum of the antibacterial substance

指示菌	抑菌圈平均直径(mm)	
	pH 值 4.0 样液	pH 值 4.0 乳酸
大肠杆菌	28.3	-
金黄色葡萄球菌	30.8	-
枯草芽孢杆菌	23.2	-
蜡样芽孢杆菌	20.8	-
产气荚膜梭菌	27.3	-
沙门氏菌	33.6	-
绵羊李斯特氏菌	25.8	-
西尔李斯特氏菌	28.1	-
嗜酸乳杆菌	-	-
保加利亚乳杆菌	-	-
嗜热链球菌	-	-

的 pH 范围,所以其活性受 pH 值变化的影响较大(图 1)。

2.6 抑制物质在不同 pH 值条件下对热的敏感

pH 值 4.0 的浓缩 10 倍粗提液分别在 37℃、60℃、100℃和 12℃的水浴中处理 30min 后,其抑菌活性无明显变化,粗提液的抑菌活性对热不敏感(图 2)。

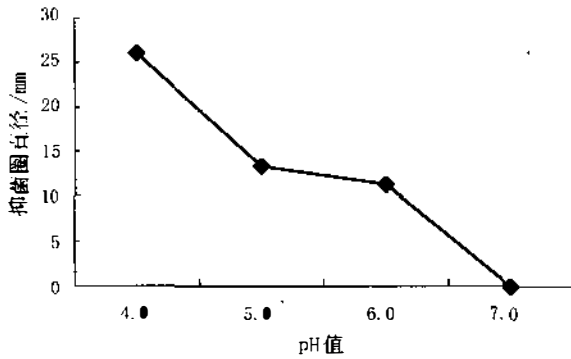


图 1 不同 pH 值下的抑制菌活性
Fig.1 Inhibitory activity at different pH

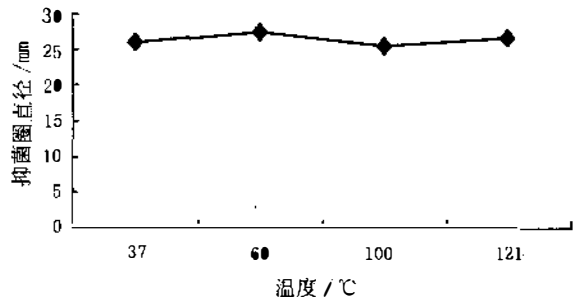


图 2 抑菌活性对热的敏感性
Fig.2 Sensitivity of inhibitory activity to heat

2.7 紫外照射对抑菌活性的影响

样品在紫外灯下照射 1h 后,其抑菌活性与未经照射的样品相比并无明显差异,说明其活性不受紫外照射的影响(表 6)。

表 6 紫外光照射对抑菌活性的影响

Tab.6 Inhibitory activity affected by UV

指示菌	培养基	抑菌圈平均直径 (mm)	
		经紫外照射样品	未经紫外照射对照液
蜡样芽孢杆菌	MYP 琼脂	22.2	22.8

2.8 发酵过程中生化参数的变化

该微生态制剂的发酵起始菌种 *L.*

plantarum 生长较快,发酵 6h 后即进入稳定期,但发酵液中蛋白质浓度还在不断增加,抑菌物质的浓度也不断增加,且其抑菌活性与蛋白质浓度变化、pH 值变化紧密相关,即随着 pH 值的降低而不断增加,随着蛋白质浓度的增加其抑菌活性增强,可以认为该抑菌物质可能是一种蛋白类物质,其产生及活性均受 pH 值的调节,因而发酵达到一定的 pH 值后表现出最大的活力(图 3)。

3 结论

(1) 该微生态制剂在发酵过程中, *L. plantarum* 代谢产生一种广谱的抑菌物质,对一些常见的食物腐败菌和致病菌均有较好的抑制作用,对乳酸杆菌和乳链球菌人体有益菌则无抑制作用。

(2) 抑菌物质粗提液的生化性质:①粗提液显示抑菌活性的 pH 值范围为 4.0~6.0, pH 值变化对其活性影响较大, pH 值为 7.0 时活性全部消失;②粗提液对热不敏感, 121℃ 加热处理 30min 后,粗提液的抑菌活性无明显变化;③紫外光照射也不能使该活性丧失。

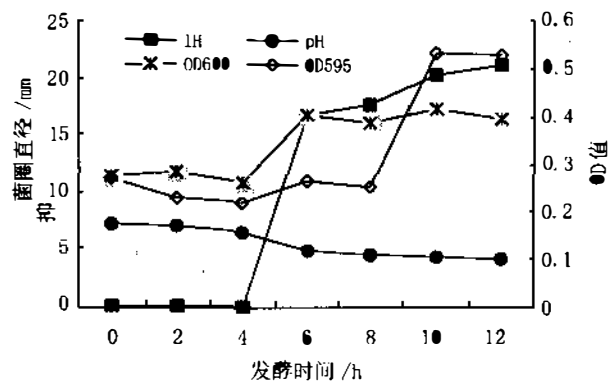


图 3 发酵过程中 pH, OD₆₀₀, OD₅₉₅, IH 的变化
Fig.3 Detection of pH, OD₆₀₀, OD₅₉₅, IH during fermentation

由该抑菌物质的上述生化性质可以推断它可能是一种分子量比较小,结构比较简单的细菌素,因而

对环境因素变化的抗性很大。

(3)随发酵时间的延长,发酵液中的抑菌活性物质逐渐增加。

(4)该活性物质不仅能抑制革兰氏阳性菌,而且对革兰氏阴性菌也有较好的抑制作用。

化学防腐剂潜在的安全隐患愈来愈不容忽视,寻找一种新的代用品以减少化学防腐剂所造成的潜在危险已为各国科研工作者所瞩目,这也是本文的研究目的所在。乳酸菌产生的细菌素以其对动物的无毒性,无抗原性,可杀死一些食品腐败菌和致病菌,对热稳定,且易被人体消化道的一些蛋白酶所破坏,不会在人体引起不良反应等特性而被认为具有广阔前景。细菌素将会在食品发酵、食品保藏和肠道生态等方面发挥越来越重要的作用。

参考文献:

- [1] 康白. 微生态学原理[M]. 大连:大连出版社,1995. 131-133.
- [2] 赛红,康白. 微生态调节剂及细菌类生物反应调节剂抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国微生态杂志,1999,11(2):61-63
- [3] 顾瑞霞,伊萌. 乳酸菌抗肿瘤特性的研究进展[J]. 中国微生态学杂志,1999,11(4):253-255.
- [4] 刁治民,于学军. 发酵乳的营养价值及保健作用[J]. 中国乳品工业,1998.26(5):11-14.
- [5] 范秀容,沈萍. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,1980. 112-118.
- [6] 陈有容,齐凤兰,丁卓平. 微生态制剂中双歧杆菌快速特异鉴定方法——指纹图谱法[J]. 中国食品学报. 1998,2:2,28-32
- [7] 北京大学生化教研室编. 生物化学实验技术[M]. 北京:高等教育出版社,1980. 68-71.
- [8] Marion M, Bradford. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein of Protein Dye Binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72, 248-254.
- [9] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1983. 85-88.